



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **BR 102016021926-4 A2**

(22) **Data do Depósito:** 23/09/2016

(43) **Data da Publicação:** 02/05/2018



(54) Título: COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO

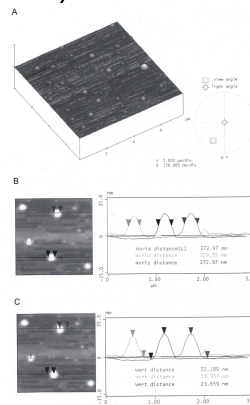
(51) Int. Cl.: A61K 31/00; A61K 9/00; A61K 31/765; C07C 49/00; A61K 31/365; (...)

(52) CPC: A61K 31/00, A61K 9/0092, A61K 31/765, C08L 2203/02, C08L 2205/18, C07C 49/00, C08G 2230/00, A61K 31/365, B82Y 30/00, C08L 2205/00, C01P 2004/64, A61K 9/107, A61L 2430/02, C08F 6/14, C08J 5/00, C08K 9/10

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI - UFVJM, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

(72) Inventor(es): DALILA PINTO MALAQUIAS; ELAINE AMARAL LEITE; JUAN PEDRO BRETAS ROA; ÁLVARO DUTRA DE CARVALHO JÚNIOR

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO A presente invenção visa a produção de nanoesferas de blendas de poli(3-hidroxibutirato)/poli(e-caprolactona) que contenham Sinvastatina preferencialmente, mas que poderão conter outros tipos de estatinas. Este invento tem capacidade de promover a modulação da regeneração óssea em patologias conhecidas como degenerações ósseas, mais precisamente a osteoartrite que é uma doença caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração da micro arquitetura do tecido ósseo com consequente aumento da fragilidade e susceptibilidade à fratura; e em casos de necessidade de cicatrização/consolidação óssea decorrente de fraturas. A proposta baseia-se na utilização de sistema de liberação de fármaco (Estatinas) constituído por partículas(micro e nano) de blendas de poli(3- hidroxibutirato)/poli(e-caprolactona)



COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO

[01] Campo de invenção

[02] A presente invenção pertence ao campo dos nanocompostos poliméricos na utilização farmacêutica. E refere-se à preparação de nanopartículas de blendas de PHB/PCL pelo método de emulsificação e evaporação do solvente.

[03] Fundamentos da invenção

[04] A liberação controlada de fármacos tem como objetivo principal proporcionar redução dos efeitos adversos, diminuição do número de doses, e consequentemente maior facilidade da adesão do paciente ao tratamento mantendo o efeito terapêutico desejado (FLEIGE, E.; QUADIR, M. A.; HAAG, R. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.64, n.9, p.866-884, 2012). Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada pode promover o benefício clínico da administração seja potencializando o efeito farmacológico e minimizando os efeitos adversos. Os principais sistemas utilizados, incluem-se os lipossomas, as micropartículas e as nanopartículas (TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, 302–315, 2012).

[05] Vários polímeros têm sido empregados na preparação de sistemas matriciais sendo possível manipular inúmeras funcionalidades mantendo a biocompatibilidade e estabilidade (KIM, J. K. et al. Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery. *Archives of pharmacal research*, v. 37, n. 1, p. 60–8, 2014).

[06] Um requisito importante para que os materiais poliméricos possam ser utilizados na preparação de sistemas de liberação de fármacos é que estes e os seus produtos de degradação não sejam tóxicos, e que apresentem uma boa biocompatibilidade, pelo menos nos tecidos com que vão ter contato direto (BIDONE, et al. Preparation and characterization of ibuprofen-

loaded microspheres consisting of poly (3-hydroxybutyrate) and methoxy poly (ethylene glycol)-b-poly (D,L-lactide) blends or poly(3-hydroxybutyrate) and gelatin composites for controlled drug release. *Materials Science and Engineering*, p. 588–593, 2009).

[07] Outra propriedade determinante na viabilidade de um polímero é se este é biodegradável ou não biodegradável. Um polímero biodegradável pode ser definido como um polímero que sofre degradação química in vivo, por hidrólise ou ação enzimática, originando produtos não tóxicos e biocompatíveis capazes de ser metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas normais (LUCKACHAN, G. E.; PILLAI, C. K. S. *Biodegradable Polymers - A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. Journal of Polymers and the Environment*, v. 19, n. 3, p. 637–676, 2011).

[08] O PHB é um poliéster produzido por bactérias, podendo ser obtido por exemplo, *Alcaligenes eutrophus* e *Rhodospirillum rubrum* que ocorrem naturalmente no solo, ou por rota sintética. É obtido de fontes renováveis, facilmente biodegradado enzimaticamente ou em solos de compostagem, sendo ainda biorreabsorvível e biocompatível, podendo ser usado em implantes médicos ou como substrato para crescimento celular (BUGNICOURT, E. et al. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) : Review of synthesis , characteristics , processing and potential applications in packaging. Express Polymer Letters*, v. 8, n. 11, p. 791–808, 2014). O PHB é termoplástico, duro e quebradiço, altamente cristalino com uma temperatura de fusão perto de 180°C. As propriedades físicas são comparáveis ai prolipropileno, por possuir ponte de fusão cristalinidade e temperatura de transição vítrea similares (QUENTAL, A. C. et al. *Blendas de PHB e seus copolímeros: Miscibilidade e compatibilidade. Quimica Nova*, v. 33, n. 2, p. 438–446, 2010). A Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero sintético biodegradável da família dos poliésteres, linear, hidrofóbico, parcialmente cristalino e pode ser lentamente biodegradado por microrganismos (NICOLAS, J. et al. *Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible*

polymer-based nanocarriers for drug delivery. Chemical Society reviews, v. 42, n. 3, p. 1147–235, 2013).

[09] A presente patente é surpreendente, pois apresenta pela primeira vez uma tecnologia capaz de produzir esferas em tamanho nanométrico contendo poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e poli (ε-caprolactona) (PCL) em sistemas contendo estatinas, sendo estes produtos baseados em nanotecnologia e matérias primas oriundas de fontes naturais. O presente invento apresenta ainda a capacidade de produção de sistemas que contenham estatinas, tendo a Sinvastatina como fármaco modelo desta invenção, utilizada para otimizar aspectos farmacocinéticos e biofarmacêuticos. As estatinas têm estrutura esteroide e inibem a enzima HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metil-glutaril- coenzima A reductase), a enzima responsável pela formação de colesterol no fígado. A HMG-CoA reductase também é importante na formação de lipoproteínas, sendo daí derivado os seus outros efeitos.

[010] O uso de materiais poliméricos pode ser aplicado em regeneração óssea, como mostrado no trabalho desenvolvido por Pilar (PILAR, F. D. Preparação de filmes de quitosana e PLGA com polipirrol para aplicação na regeneração nervosa (Dissertação mestrado, 2014) que associa de filme polimérico produzido com PLGA, e conclui que há aumento na desorganização da matriz, o que pode ser favorável para o desenvolvimento de estruturas aplicáveis para a regeneração óssea, pois favorece o crescimento celular, através dos poros estabelecidos nos sistemas mais irregulares. Assim como o PLGA tanto o PHB quanto o PCL são poliésteres e poderiam ser aplicados com finalidade semelhante.

[011] As estatinas vêm sendo empregadas em novas tendências terapêuticas, até então desconhecidas e apresentando resultados satisfatórios, o que amplia a pesquisa sobre esta classe de medicamentos. Alguns estudos comprovam a eficácia do uso de estatinas em neoplasias, remodelação óssea, demências entre outros (ANANTHAKRISHNAN, A.N. et al. Statin Use Is Associated With Reduced Risk of Colorectal Cancer in Patients With Use Is Associated With Reduced Risk of Colorectal Cancer in Patients With

Inflammatory Bowel Diseases. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2016.; BITTO, N. et al. Coagulation and fibrosis:

[012] A potential non-negligible target of statins in chronic hepatitis. Journal of hepatology, v. 63, nº 1, p. 277-278, 2015.: EDELMUTH, s.v.c.l. ET AL. Ação das estatinas no Tecido Ósseo. Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba, p. 1984-4840, v. 17, n. Supl, 2015.: SÁNCHEZ, jr p. ET AL. Demência vascular, demencia por cuerpos de Lewy, demência frontotemporal e otras demências. Revista Neorociências, v. 11, n. 72, p. 4323-4333, 2015.; SANFELICE, R.A. et al. Estatinas como alternativa terapêutica para a toxoplasmose. Revista de Saúde e Biologia, v. 10, n. 3, p. 113-118, 2015).

[013] Um dos efeitos esperados pela presente invenção é a modulação da regeneração óssea em patologias conhecidas como degenerações ósseas, mais precisamente a osteoartrite que é uma doença caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração da micro arquitetura do tecido ósseo com consequente aumento da fragilidade e susceptibilidade à fratura; e em casos de necessidade de cicatrização/consolidação óssea decorrente de fraturas. A proposta baseia-se na utilização de sistema de liberação de fármaco (Estatinas) constituído por partículas (micro e mano) de blendas de poli (3-hidroxiбутирато)/ poli (ε-caprolactona). As estatinas, como efeito pleiotrópico, atuam inibindo a formação de osteoclastos pela intervenção da possibilidade de que pequenas enzimas GTPases provindas dos produtos da síntese do colesterol, regulem negativamente a expressão da proteína óssea BMP-2, um dos principais fatores de crescimento na formação óssea.

[014] Preparação das Micropartículas

[015] Jang e colaboradores [Hollow porous poly(ε-caprolactone) microspheres by emulsion solvent extraction. Materials Letters, v.72, p.157-159, 2012] e Suave e colaboradores [Biodegradable Microspheres of Poly(3-hydroxybutyrate) / Poly(ε-caprolactone) loaded with Malathion Pesticide: Preparation, Characterization, and In Vitro Controlled Release Testing. Journal of Applied Polymer Science, v. 117, p. 3419–3427, 2010] já descreveram o

preparo de microesferas pelo método de emulsão/evaporação do solvente utilizando blendas de PCL/ PCL.

[016] O documento CN 103462902A relata um método de preparo de microesferas de PLGA/PCL que compreende a mistura destes polímeros em um solvente orgânico sendo aspergidos em um solvente polar sob agitação e secagem do solvente.

[017] O documento CN 101108168A descreve um método de preparação de liberação controlada de fulvestrato. Neste método utiliza os polímeros PLA ou PLGA ou PCL ou qualquer outro polímero biodegradável. A invenção utiliza a formação de emulsões com líquidos imiscíveis com Tween 80 no meio de dispersão, havendo mistura mecânica e terminando a preparação com a evaporação do solvente da emulsão. Nessa invenção obtiveram uma taxa de encapsulação de 80% dos fármacos.

[018] A presente invenção formulou nanoesferas contendo sinvastatina utilizando a blenda PHB/PCL na proporção 20/80. Para o preparo das nanoesferas, 5 mL da solução da blenda PHB/PCL 0,1% correspondente a 5 mg de polímero juntamente com 1mL de solução clorofórmica de sinvastatina (1mg/mL), foram injetados, com o auxílio de uma seringa de vidro, lentamente em 45 mL de etanol em banho de gelo. Em seguida, 50 mL de água Milli Q foram adicionados lentamente e a dispersão foi mantida sob agitação a 9500 rpm por 5 minutos, utilizando o equipamento ultra turrax (IKA T25, Staufen, Alemanha), sonda G18. A emulsão formada foi transferida para um balão de vidro e o solvente foi evaporado em um rotaevaporador Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça). Os parâmetros utilizados para evaporação foram: rotação de 40 rpm, temperatura do banho-maria a 40 °C e tempo de evaporação igual a 30 minutos. Após a evaporação do solvente, a formulação foi transferida para um tubo falcon de 50 mL e a fração de sinvastatina não encapsulada foi removida por centrifugação (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge, Alemanha) a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Por fim, o

sobrenadante contendo as NE-SV foi separado e armazenado em geladeira a 4 °C.

[019] Seguindo este procedimento, foram obtidas nanoesferas com tamanho médio de 260 nm, índice d polidispersão de 0,12, potencial zeta em torno de -30 mV e 63% em massa de sinvastatina associada ao sistema.

[020] Analisando as nanoesferas por microscopia de força atômica (AFM) é possível observar partículas esféricas, achatadas e de superfície rugosa. Este dado é evidenciado na Figura 01.

[021] Descrição detalhada da figura:

Figura 01. Imagem das nanoesfera obtida por AFM em visão tridimensional (A). Perfil topográfico das NE-BR demonstrando o diâmetro (B) e a altura (C).

REIVINDICAÇÕES

1. **“COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO”** caracterizado pela produção de nanoesferas de misturas contendo Polo (3-hidroxibutirato) (PHB) e poli (ϵ -caprolactona), denominadas nanoesferas de blendas PHB/PCL.
2. **“COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO”** considerando a **Reivindicação 1**, caracterizado pela produção de nanoesferas de blendas PHB/PCL que contenham Sinvastatina preferencialmente, mas que poderão conter outros tipos de estatinas.
3. **“COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO”** considerando a Reivindicação 1 e 2, caracterizada pelas nanoesferas serem produzidas nas proporções de Poli (3-hidroxibutirato) (PHB) contendo até 30% em massa na misturacom poli (ϵ -caprolactona), preferencialmente 20% em massa de PHB.
4. **“COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO”** considerando as Reivindicações 1 a 3, caracterizada pelas nanoesferas serem produzidas capazes de apresentar taxa de encapsulação contendo 20% em massa de sinvastatina.
5. **“COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO”**, considerando a Reivindicação 4, caracterizado pelas nanoesferas de blendas PHB/PCL apresentarem maior concentração de fármaco associado à superfície e uma proporção menor oresente no interior do produto.
6. **“COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO”** considerando as

Reivindicações 1 a 5, caracterizada pelas nanoesferas de blendas PHB/PCL serem preparadas em solução, preferencialmente utilizando Clorofórmio como solvente pelo método de emulsificação e evaporação do solvente.

7. **“COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO”**, considerando as Reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo uso das nanoesferas ser capaz de encapsular sinvastatina poder também ser utilizado e ajustado para encapsular outros fármacos, sendo um veículo para a liberação controlada de quaisquer fármacos utilizados.

8. **“COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO”**, considerando as Reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo uso das nanoesferas ser possível a sua utilização para materiais ou sistemas de liberação de fármacos da classe das estatinas que auxiliem, dentre outras aplicações, na regeneração, cicatrização, fixação e reconstituição de tecido ósseo.

FIGURA

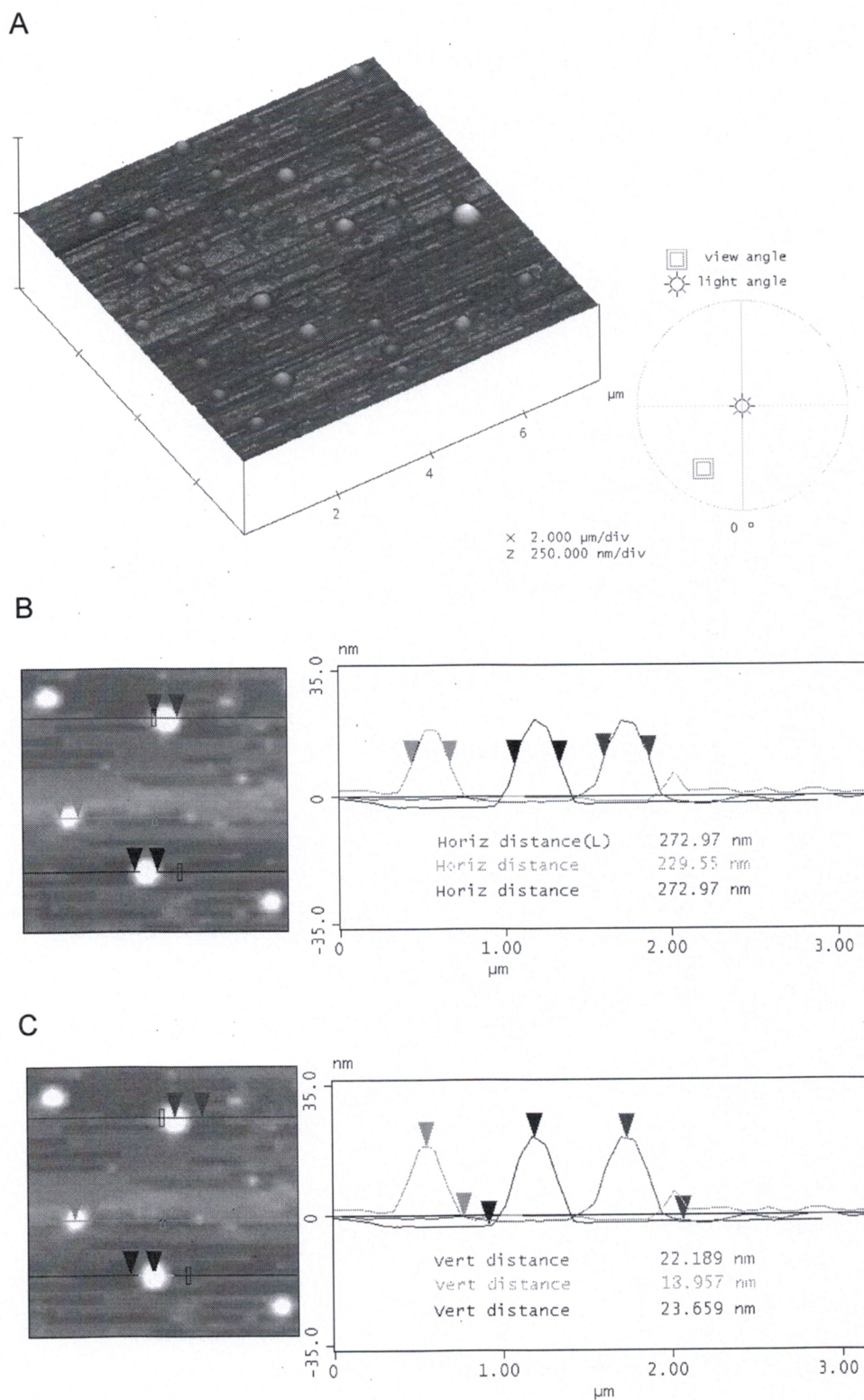


FIGURA 1

RESUMO

“COMPOSIÇÕES DE NANOESFERAS DE PHB/PCL CONTENDO ESTATINAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO E USO”

A patente de invenção visa a produção de nanoesferas de blendas de poli(3-hidroxibutirato)/Poli(ε-caprolactona) que contenham Sinvastatina preferencialmente, mas que poderão conter outros tipos de estatinas. Este invento tem capacidade de promover a modulação da regeneração óssea em patologias conhecidas como degenerações ósseas, mais precisamente a osteoartrite que é uma doença caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração da micro arquitetura do tecido ósseo com consequente aumento da fragilidade e suscetibilidade à fratura ; e em casos de necessidade de cicatrização /consolidação óssea decorrente de fraturas. A proposta baseia-se na utilização de sistema de liberação de fármaco (Estatinas) constituído por partículas (micro e nano) de blendas de poli(3-hidroxibutirato)/poli(ε-caprolactona).